

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-513072

(P2001-513072A)

(43) 公表日 平成13年8月28日 (2001.8.28)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テマコード<sup>\*</sup> (参考)

A 61 K 38/55  
35/78

A 61 K 35/78

J

A 61 P 13/08  
15/00

A 61 P 13/08

C

15/00  
15/10

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-526158

(86) (22) 出願日 平成9年1月16日 (1997.1.16)

(85) 翻訳文提出日 平成10年7月21日 (1998.7.21)

(86) 國際出願番号 PCT/US97/00643

(87) 國際公開番号 WO97/25961

(87) 國際公開日 平成9年7月24日 (1997.7.24)

(31) 優先権主張番号 08/588, 462

(32) 優先日 平成8年1月18日 (1996.1.18)

(33) 優先権主張国 米国 (U.S.)

(71) 出願人 ザ・トラスティーズ・オブ・ザ・ユニバー

シティ・オブ・ペンシルバニア

アメリカ合衆国ペンシルバニア州19104,

フィラデルフィア, マーケット・ストリー

ト 3700, スウィート 300, センター・

フォー・テクノロジー・トランシスター

(71) 出願人 クラーク, ラリー・シー

アメリカ合衆国アリゾナ州85745, ツーソ

ン, アイロンウッド・ヒルズ 4315

(74) 代理人 弁理士 社本 一夫 (外5名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 男性または雄の性的機能不全のためのボーマン・パークインヒビター

(57) 【要約】

尿生殖管／骨盤部の異常状態または疾患の治療のためのボーマン・パークインヒビターを含有する組成物を提供する。このような状態および疾患の治療においてこの組成物を使用する方法も提供する。

**【特許請求の範囲】**

1. 尿生殖管の疾患の治療用のBBIを含む組成物。
2. 疾患が、前立腺、膀胱または尿道の疾患である請求項1に記載の組成物。  
。
3. 男性また雄の性的機能不全の治療用のBBIを含む組成物。
4. 薬学的に許容しうる担体を更に含む請求項1に記載の組成物。
5. 薬学的に許容しうる担体を更に含む請求項3に記載の組成物。
6. 動物の骨盤部の疾患または異常状態を治療する方法であって、骨盤部の疾患または異常状態を有する動物に対して有効量のBBIを投与することを含む上記方法。
7. BBIを、薬学的に許容しうる担体と組合わせて投与する請求項6に記載の方法。
8. 疾患が、前立腺または膀胱の疾患である請求項6に記載の方法。
9. 疾患が、前立腺炎、良性前立腺過形成または前立腺の腺癌である請求項8に記載の方法。
10. 前記状態が男性また雄の性的機能不全である請求項6に記載の方法。

### 【発明の詳細な説明】

男性または雄の性的機能不全のためのボーマン・バークインヒビター

#### 発明の背景

本発明は、男性または雄の性的機能不全および泌尿器症状を伴う平滑筋収縮、炎症、および前立腺炎、良性前立腺過形成および前立腺の腺癌を含めたいくつかの一般的な前立腺疾患の処置に関する骨盤部で起こる疾患症状の緩和並びに異常状態の治療のための組成物および方法に関する。本発明が当てはまる症状は、尿生殖管に関する医学的問題に関する全てである。男性人口の約半数は、成人期中に前立腺の炎症症状を経験する。良性前立腺過形成（BPH）は、老化に関連し且つホルモン循環の変化に関する疾患である。過形成前立腺が肥大するにつれて、それが尿道を圧迫し、そして膀胱を完全に空にさせることができない。BPHのための最も一般的な処置は手術である。若干の場合、バルーン拡張法またはテラゾシンおよびプラゾシンなどの $\alpha$ 1遮断薬を用いる薬物療法が用いられる。抗男性ホルモン療法もまた、前立腺閉塞を緩和することができる。

前立腺の癌は、55才を越える男性において重大な死因である。前立腺癌の病因はまだ知られていない。初期の前立腺癌は無症候性である。その疾患が広がるにつれて、それは泌尿器閉塞を引き起こすことがある。血清中酸性ホスファターゼの測定は、転移性前立腺癌の基本的スクリーニングテストである。血清中の血清前立腺特異的抗原（PSA）レベルの上昇は、前立腺癌の早期検出のための最も敏感な試験である。血清PSAレベルは、局所疾患で上昇することがあるが、酸性ホスファターゼレベルの上昇は、通常、前立腺外の疾患を示す。診断および治療後に、反応を評価するための血清PSAレベルの連続測定を行う。治療には、手術、放射線およびホルモン療法が含まれる。細胞障害性化学療法は、これまでのところ有効性が証明されていない。

プロテアーゼインヒビターは、マメ類、穀類、木の実、果実および野菜などの多数の異なる種類の食物中で一般的に見出される化合物の種類である。最もよく特性決定されたプロテアーゼインヒビターの一つは、ダイズに由来するボーマ

ン・バークインヒビター（Bowman-Birk Inhibitor：BBI）である。それは、

7個のジスルフィド結合を有する71アミノ酸鎖であり、種々の結合部位にトリプシンおよびキモトリプシンと1:1で結合し、そして約8000の分子量を有する。

プロテアーゼインヒビター、特に、BBIのin vivoおよびin vitro研究は、それらが有効な抗発癌薬であることを示した。ボーマン (Bowman) , Proc.Soc.Exptl.Med.1946,63,547、およびバーク (Birk) ら, Bull.Res.Council Israel 1962,第1項, 11,48およびBiochim.Biophys.Acta 1963,67,326で記載され、そしてその後、ボーマン・バークインヒビター (BBI) と称された酵素阻害物質は、培養中および実験動物中の細胞の放射線医学的にまたは化学的に誘発された悪性トランスフォーメーションを妨げる、または少なくとも大きく減少させるある種の生理的活性を有することが示された。

ヤヴェロウ (Yavelow) ら, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1985,82,5395-5399は、粗製ダイズ抽出物が、アセトンで脱脂された場合、細胞トランスフォーメーションをin vitroで有効に阻止したことを報告した。これらの知見は、疫学的データと共に、BBIを、特に、結腸癌に関する推定上の抗発癌食として示唆した。

ウイード (Weed) ら, Carcinogenesis 1985,6,1239-1241は、ジメチルヒドラジン (DMH) で処置されたマウスの餌に加えられたボーマン・バークプロテアーゼインヒビターを含有するダイズ抽出物が、結腸粘膜の腺腫様腫瘍の有意の抑制を引き起こしたことを開示している。マウスのDMHで誘発された結腸癌は、概して、ヒト疾患の優れた動物モデルと考えられ、ヒト結腸で発生する腫瘍と類似の結腸および直腸の腺癌を誘発する発癌物質処置は、研究された種類の食品添加物が、望ましくない副作用を伴うことなく、ヒト結腸癌の発生に対してある種の防御を与えるらしいということを示唆している。BBI抽出物およびその製造方法は、ヤヴェロウら, Cancer Res.1983,43,2454-2459; Proc.Natl.Acad.Sci.U SA 1985,82,5395-5399で記載された通りであった。

メサディ (Messadi) ら, JNCI 1986,76,447-452は、プロテアーゼインヒビター-BBIを含有するダイズ抽出物が、ハムスター頬袋の7, 12-ジメチルベンズ [a] アントラセン (DMBA) で誘発された発癌を抑制することを示した。

この口腔癌モデルは、最も一般的な形のヒト口腔癌である偏平上皮細胞癌と同様の組織病理学、成長パターンおよび前癌病変を有する。この研究において、ハムスター頸袋発癌はB B Iによって阻止されうることが示され、そしてヒト口腔発癌はB B Iに対して同様に反応するらしいことが示唆された。この研究で用いられたB B I標品は、ヤヴェロウら, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1985,82,5395-5399で記載のように製造された阻害物質の粗製抽出物であった。

バツレー (Baturay) ら, Cell Biology and Toxicology 1986,2,21-32は、粗製ダイズ抽出物をアセトンで脱脂したB B I標品が、放射線でおよび化学的に誘発された*in vitro*のトランスフォーメーションを、発癌補助物質ピレンによる増強を伴ってまたは伴うことなく抑制することを開示している。ヤヴェロウら, 1985年は、純B B Iかまたは彼らの方法によって製造されたB B I抽出物が、C 3 H 1 0 T 1 / 2細胞の放射線で誘発されたトランスフォーメーションを抑制することを示している。ケネディ (Kennedy) ら, 1984年は、純B B Iかまたは彼らの方法によって製造されたB B I抽出物が、ブルーム症候群の患者の細胞中の染色体異常のレベルを低下させることを報告している（高レベルの染色体異常は、それらの患者を普通より高い癌発生率にすると考えられる）。また、他の研究は、ダイズ由来プロテアーゼインヒビターが、皮膚癌、乳癌および肝臓癌に対して*in vivo*で抑制作用を有しうることを示唆している。

ケネディらは、Anticarcinogenesis and Radiation Protection, セルッティ (Cerutti) ら監修のPlenum Pub.Co.1987,285-295頁において、ダイズをアセトンで脱脂することによって製造された粗製B B I抽出物を用いて、B B Iが様々な系の発癌を抑制することを開示している。彼らの結果は、極めて低い濃度のB B I型プロテアーゼインヒビター標品が、結腸癌の化学的予防薬として有効と考えられることを示唆した。化学的予防薬としてのプロテアーゼインヒビターの使用が、起こりうる毒性問題によって複雑になると示唆されたことはなかった。

セント・クレア (St.Clair) ら, Cancer Res.1990,50,580-586は、DMHで処置されたマウスの餌に対する0. 5 %または0. 1 %半精製B B Iの添加が、血管肉腫並びに肝臓および結腸の発癌の結節性過形成を統計的に有意に抑制したことを見出している。この研究の結果はまた、飼料の0. 5 %またはそれ未満と

して包含されたB B Iがマウスの健康に対して悪影響を及ぼすことはなかったが、肝臓および結腸の発癌を抑制する能力を有したことを見ている。

ボーマン・バークインヒビター濃厚物 (Bowman-Birk Inhibitor concentrate : B B I C) と称されるB B Iが豊富なダイズ抽出物は、食品医薬品庁から治験新薬資格 (Investigational New Drug Status) を得、そしてそれをヒト癌化学療法薬として評価するヒト試行が開始された。

フレンケル (Frenkel) ら、Carcinogenesis 1987, 8(9), 1207-1212は、プロテアーゼインヒビターおよび／またはスーパーオキシドジスムターゼ (S O D) の不存在下または存在下における12-O-テトラデノイルホルボール-13-アセテート (T P A) で活性化された多形核白血球 (P M N) によるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の生成を監視した。試験されたプロテアーゼインヒビターには、ジャガイモインヒビター-1 (P t I - 1) および2 (P t I - 2) 、P t I - 2のキモトリプシン阻害フラグメント (P C I - 2) 、ニワトリオボインヒビター (C O I) 、シチメンチョウオボムコイドオボインヒビター (T O O I) 、ボーマン・バークインヒビター (B B I) 、ライマメインヒビター (L B I) およびダイズ (クニツツ (Ku nitz) ) トリプシンインヒビター (S P T I) が含まれた。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成の阻害によって測定される活性の順序は、P t I - 1 > P C I - 2 > P t I - 2 > C O I > B B I > T O O I > L B I > S P T I であり、したがって、キモトリプシンに特異的であるがトリプシン特異的でないプロテアーゼインヒビターは、刺激されたヒトP M Nの酸化バースト中に活性酸素種の生成を阻害することができるということが示された。B B Iは、キモトリプシンおよびトリプシン両方の阻害物質として特性決定された。

パールマン (Perlmann) ら、Methods in Enzymology 1970, 19, 860-861は、脱脂ダイズ抽出物からB B Iを得る精巧な方法を記載した。

米国特許第4,793,996号 (ケネディら) は、B B Iを得るための、ダイズをアセトンで処理した後、エタノール抽出およびアセトン沈澱を行うことを含む方法を開示している。ダイズは、アセトン処理の前に脱脂してよい。更に、B B Iは、慣用的な技法によって更に精製してよい。ケネディらは、ダイズからB B Iを製造する慣用的な工程において、細胞の悪性トランスフォーメーションを阻止す

る

B B I の能力に悪影響を与える因子が残っていることを発見した。その因子が除去された場合、得られたB B I 生成物は、細胞の悪性トランスフォーメーションを阻止することができた。パールマンによって考えられたエタノール抽出工程の前にダイズをアセトンで処理することにより、この因子を除去するのが可能であることが判った。

ケネディらは、その生成物が1種類のタンパク質だけを含有する場合、適切に、抽出物の完全な精製を必要とする手順を行う必要はないことを示している。その代わり、彼らは、粗製インヒビター抽出物が得られた時点で精製操作を停止するのが有効であることを見出した。この粗製抽出物は、それ自体食用であり、そして例えば、経口摂取によって細胞の悪性トランスフォーメーションの阻害物質として用いることができる。ケネディらは、脱脂ダイズを含む悪性細胞トランスフォーメーションの阻害物質を含有する粗製ダイズ抽出物を製造し、そして該阻害物質を該脱脂ダイズから抽出する方法を開示している。

#### 発明の概要

本発明の目的は、泌尿器症状および男性または雄の性的機能不全をもたらす平滑筋収縮に関連して尿生殖管／骨盤部で起こるいくつかの異常状態の治療、並びにいくつかの前立腺疾患の治療のためのB B I 組成物を提供することである。

本発明のもう一つの目的は、このような状態および疾患を治療する方法であつて、その状態または疾患有する動物に対して有効量のB B I を投与することを含む上記方法を提供することである。

#### 図面の簡単な説明

図1は、P B B I またはボーマン・バークインヒビター濃厚物（B B I C）を含有する培地中で培養されたL N C a P 細胞の成長曲線を示す。L N C a P 細胞を60mm組織培養皿中に平板培養し且つ対照培地またはP B B I 若しくはB B I Cを50μg/m1含有する培地中で8日間インキュベートした。それぞれの群からの細胞の3皿をトリプシンで処理し、そしてインキュベーション期間中に（5日目を除く）24時間ごとにクールター（Coulter）計数計で計数した。そ

それぞれのデータ点は、少なくとも2回の独立した実験の平均を示す（平均値士S.E.）。

図2は、PBBIまたはBBCを含有する培地中で培養された、トランスフォーメーションされた前立腺細胞267B1/Ki-rasの成長曲線を示す。細胞を60mm組織培養皿中に平板培養し且つ対照培地またはPBBI若しくはBBCを50μg/ml含有する培地中で9日間インキュベートした。それぞれの群からの細胞の皿をトリプシンで処理した後、インキュベーション期間中にほぼ1日間隔でクールター計数計を用いて計数した。それぞれのデータ点は、2回の独立した実験からの少なくとも3個のデータ点の平均を示す（平均値士S.E.）。「白丸」は未処理の267B1/Ki-ras細胞であり；「x」はPBBIで処理された267B1/Ki-ras細胞であり；そして「白三角」はBBCで処理された267B1/Ki-ras細胞である。

図3は、図2で267B1/Ki-ras細胞について記載されたのと同様の条件下においてPBBIまたはBBC含有培地中で培養されたPC-3細胞の成長曲線を示す。それぞれのデータ点は、2回の独立した実験からの少なくとも3個のデータ点の平均を示す（平均値士S.E.）。「白丸」は未処理のPC-3細胞であり；「x」はPBBIで処理されたPC-3細胞であり；そして「白三角」はBBCで処理されたPC-3細胞である。

図4は、BPHおよび前立腺癌患者におけるBBC投与後の血清PSA濃度の時間経過を示す。患者は、100キモトリプシン阻害単位を含有するダイズ製剤（BBC）を全12日間毎日摂取した。血清PSAレベルは、ハイブリテク（Hybritech）タンデム-Kキットを用いて標準PSA免疫検定によって測定された。図5は、口腔白斑症の患者におけるBBC投与後の血清PSA濃度の時間経過を示す。患者は、400C.I.単位を含有するBBCの1回量を摂取した。血清PSA濃度は、精製ヒトPSAを標準として用いる二重抗体サンドイッチELISAで測定された。

#### 発明の詳細な説明

前立腺癌は、米国男性人口の主な死亡原因であり且つ2番目に一般的な癌であ

る。前立腺癌の発症率は、過去10年間の間に約50%増加し、1994年には、米国内で新たに200,000例の前立腺癌が診断され、そして38,000人が前立腺癌で亡くなった。前立腺癌は、根治的前立腺切除または放射線療法で治療されうるが、しかしながら、多くの前立腺癌患者は治癒することができない。進行した前立腺癌（T1-T2 Nx腫瘍と称される）の患者の40%未満は、慣用的な放射線療法で治癒することができ、そしてその治癒率は、更に進行した段階の前立腺癌（T3-T4 Nx腫瘍と称される）の患者では更に20%未満まで低下することが報告された。前立腺癌の再発の大部分は、手術でも放射線でも有効に治療することができない遠位転移を伴う。したがって、残存する前立腺癌細胞を死滅させるまたはそれらの成長、浸潤および転移を阻止する薬剤を用いる化学療法で前立腺切除または放射線療法を補足するならば、前立腺癌の患者にとって有益であると考えられる。一つのこのような薬剤は、ボーマン・バークインヒビター（BBI）として知られるダイズ由来セリンプロテアーゼインヒビターである。

BBIは、多数の組織培養系の細胞の悪性トランスフォーメーションを阻止することが示された強力な抗発癌プロテアーゼインヒビターである（ケネディ、A R, Protease Inhibitors As Cancer Chemopreventive Agents, ケネディおよびトロル（Troll）監修, プレナム・プレス（Plenum Press）, ニューヨーク, 1993年, 65-91頁）。広範囲にわたる研究はまた、BBIが腫瘍発生を抑制できるし且つ化学的発癌物質または放射線で処理された動物のいくつかの種の発癌率を低下させうることを示した（ケネディ、A R, Protease Inhibitors As Cancer Chemopreventive Agents, ケネディおよびトロル監修, プレナム・プレス, ニューヨーク, 1993年, 9-46頁）。研究は、BBIがヒト前立腺癌細胞を死滅させるかまたはそれらの成長を阻止することができることを示している。

前立腺癌細胞の成長および生存に対するBBIの作用は、LNCaP細胞を用いて実証された。これら細胞は、転移性前立腺腺癌と確実に診断された50才の白人男性のリンパ節から最初に由來した。これらの実験の結果は図1で要約されるが、これは、培地中へのBBIの含有が、対照培地と比較したところ、前立腺癌細胞の成長速度を有意に低下させたことを示している。精製BBI（PBBI

) および B B I 濃厚物 (B B I C) として知られる B B I が豊富なダイズ製剤を用

いたが、両者とも、前立腺癌細胞の成長速度を同程度まで低下させた。P B B I および B B I C のこのような作用は、成長阻害かまたは細胞障害性、或いはこれらの機序両方の組合せに起因しうる。コロニー形成を測定する更に別の研究は、P B B I または B B I C を用いる細胞の処理が、L N C a P 細胞に対する P B B I または B B I C の直接毒性作用によって引き起こされる細胞の生存部分の有意の減少を引き起こしたことを見出している。同様の細胞障害作用は、P B B I または B B I C に対して暴露された 2 種類の他のヒト前立腺癌細胞、P C - 3 および 2 6 7 B 1 / K i - r a s トランスフォーメーション細胞で見られた。P B B I および B B I C に関して 3 種類全部の細胞系に対して見られた細胞障害作用は、細胞の成長曲線において成長遅滞をもたらす。3 種類全部の細胞系において、その成長遅滞は、細胞を平板培養してから約 50 ~ 100 時間後に P B B I / B B I C 処理に関して明らかになり、初期細胞障害作用を反映した。成長遅滞を引き起こすことに加えて、P B B I および B B I C 処理は、細胞培養物中でより低い飽和密度をもたらす。図 1、2 および 3 を参照されたい。

P B B I はまた、P C - 3 細胞からのならし培地を化学誘因剤として用いる場合、L N C a P 細胞の浸潤能力に対して有意の作用を有することが判った。

補助食として与えられた B B I C がインビボ (in vivo) のヒト前立腺癌、更には骨盤部の他の疾患に対して作用を有するということも示されている。B B I C は癌予防薬として開発されてきたが、現在はヒト試行で評価されている。B B I もまた、抗炎症活性を有することが判った。B B I C で処置された一人の患者の体験は、B B I が、尿生殖管 / 骨盤部の器官の疾患症状 / 異常状態に対して主に作用するらしいことを示唆し、これら作用は、B B I の抗炎症活性または平滑筋収縮を調節する B B I の能力、そしておそらくは、良性前立腺過形成および / または前立腺癌を引き起こす異型前立腺細胞を破壊する B B I の能力のためであると考えられる。12 日間の B B I C 処置 2 回の間に、その患者は、良性前立腺過形成 (B P H) のためであると考えられる泌尿器症状の改善に気付いた。その

症状は、B B I C治療を中断した場合、ベースラインに逆戻りした。B B I C治療中に、その患者は、既存の性的機能不全の症状の改善にも気付いた。具体的には、B B I 使用中は、勃起し且つそれを維持する能力が正常まで回復した。

通常のB P Hの症例と同様、この患者は、異常に高い血清レベルの前立腺特異的抗原（P S A）を有した。B B I Cを100キモトリプシンインヒビター（C . I . ）単位／日で12日間用いる処置は、図4で示されるように、B B I Cが与えられる12日間にわたるB B I C治療の日数に対するP S Aのほぼ直線の用量反応関係を生じ、B B I の使用を止めた場合、P S Aは、この患者にとって正常な「高」レベルまで降下した。この患者の場合、B B I Cでの処置は、泌尿器症状をほぼ直接に緩和させた。この患者は、後に、前立腺癌を有すると診断されたが、これはB B I C治療時に存在していたと考えられる。したがって、得られたP S Aレベルの変化は、前立腺癌に対するB B I の細胞致死作用を反映しうる。図4で示された曲線は、放射線による前立腺癌の治療で見られるのと極めて似ている。放射線は、前立腺癌に関する上皮細胞を死滅させることが知られており、前立腺癌細胞が崩壊し且つそれらの含有P S Aを血液中に撒き散らすにつれて、より高い血清P S Aレベルがもたらされる。或いは、B B I 治療で上昇した血清P S Aレベルに関する知見は、B P Hの場合に存在する異型前立腺細胞に対するB B I の細胞致死作用のためであったと考えられる。

B B I 投与によって血清P S Aレベルが変化したもう一人の患者は、口腔白斑症の患者である。この患者の場合、実験を始める前から正常より高い血清P S A濃度を有し、図5で示されたように、B B I C投与後に血清P S Aレベルが極めて有意に上昇した。P S Aは、前立腺上皮細胞だけで生産されるセリンプロテアーゼである。P S Aは、精液中の主要なタンパク質成分として存在している。正常な成人男性の場合、精液中のP S A濃度は0.7m g／m l程度の高さであるが、血清P S Aレベルはその濃度の約100万分の1にすぎない。精液と血清との間のP S A濃度の大きな差は、破壊された前立腺細胞から血流中へ直接的にP S Aの放出を引き起こす前立腺細胞の破壊がなければ、通常、P S Aは血流に入らないことを示唆している。これは、前立腺癌、良性前立腺過形成（B P H

)、前立腺炎症(前立腺炎)および前立腺に対する機械的圧力などの前立腺組織に損傷を与える多数の状態が全て、血清 PSA 濃度を上昇させうるという知見によって支持される。図4で示された BPH 前立腺癌患者の場合の BBI C 投与後の血清 PSA レベルの増加は、BBI が前立腺癌細胞、または BPH を引き起こす異

型前立腺細胞を破壊して、PSA が血流中に放出されたことを示していると考えられる。口腔白斑症患者の場合の BBI C 投与後の血清 PSA レベルの著しい増加は、BBI C 処置が、前立腺細胞を死滅させ且つ血流中への PSA の放出を引き起こしたことを示唆している。BBI C での処置は、BBI C 投与前から高血清 PSA レベルを有していた患者の血清 PSA レベルを増加させたが、BBI C 治療は、BBI C 口腔癌化学的予防試行に入る前に血清 PSA レベルが正常 (< 4.0 ng/ml) であったヒト被験者においてはいずれも、血清 PSA レベルに影響を与えたかった。正常および異常血清 PSA レベルを有する人々での血清 PSA レベルに対する BBI の示差的作用は、BBI が、前立腺癌および BPH などの疾患に関与する前立腺細胞を選択的に攻撃しうるが、正常な前立腺細胞をそのまま残すことを示唆している。BBI C 口腔癌予防試行における口腔白斑症患者は、未診断の BPH または前立腺癌症例を有すると考えられ、この場合、異型前立腺細胞が存在し且つ BBI C 治療によって影響されると考えられる。BBI は、前立腺癌細胞を死滅させうるし、そしておそらくは、前立腺癌細胞の成長も阻害できる。BBI C が手術または放射線療法に対する補助として包含されるならば、これらの作用は両方とも、前立腺癌の患者にとって有益なはずである。

図4および5で示された血清 PSA 濃度の変化の時間経過は、BBI の抗炎症作用かまたは平滑筋に対する BBI の作用が、観察された作用の原因となっていることを示唆する。平滑筋に対する BBI の作用が大いに考えられる。前立腺は、膀胱から尿を排出する管である尿道を取り囲んでいる。BPH は、前立腺組織の肥大であるが、BPH の症状は、膀胱／尿道を囲む平滑筋の固さの増加によつても引き起こされることがありうる。平滑筋が固くなる場合、それは尿道を圧迫し、そして尿道中を尿が流れうる速度を遅くして、BPH に関係した泌尿器症状

を引き起こす。B B I は、平滑筋収縮を調節するその能力によって「直接的に」、B P H に関係した泌尿器症状に充分に影響を与えると考えられる。現在、B B I は、体内の重要な調節酵素である  $\alpha$ -1-アンチキモトリプシンの代わりになりうると考えられる。B B I のキモトリプシン阻害活性は、 $\alpha$ -1-アンチキモトリプシンの活性と極めて似ている。 $\alpha$ -1-アンチキモトリプシンは、平滑筋収縮において調節的役割を果たすと考えられる。尿道を取り囲む筋肉を弛緩させる

ことにより、尿は一層容易に流れ、そして B P H に関係した泌尿器症状（一般的には、「尿意急迫および尿意頻数（urgency and frequency）」問題と称される泌尿器症状）を緩和すると考えられる。同様に、血管平滑筋に対する B B I 作用は、男性的機能不全の症状に対して作用しうる。B P H および前立腺癌の患者が、B B I C 治療を開始後何時間かの内に、泌尿器症状、更には、男性的機能不全に関係した症状の緩和を感じるということ、および白斑症試行での患者が、何時間かの B B I C 治療の内に、血清 P S A レベルの変化を示したということは、平滑筋に対する B B I 作用が、異型前立腺細胞に対する B B I 細胞致死作用よりも、骨盤疾患の症状に対する B B I 作用について可能な説明であることを示唆する。平滑筋の弛緩をもたらす B B I 作用は、B B I 摂取後に極めて早く生じると考えられる。B B I は、B B I 治療から 6 時間後位に早く生じる、口腔白斑症の患者の口内頬粘膜細胞のタンパク質分解活性レベルの変化などの生物学的作用と共に、B B I 摂取直後の血液中で見られる。これは、B B I 処置が、異型前立腺細胞の破壊および結果として増加した血清 P S A レベルをもたらしたと考えられる狭窄した尿道を開かせたことを示唆する。平滑筋／排尿困難に関する B B I の作用は、女性患者にも当てはまるであろう。女性患者もまた、尿道／膀胱を取り囲む平滑筋の問題による排尿の「頻数および急迫」を伴う困難を有する。

本発明において、骨盤部の疾患または異型状態の治療のための B B I を含む組成物を提供する。好ましい実施態様において、これら組成物は、薬学的に許容し得る担体を更に含む。「B B I」により、いずれのボーマン・バークインヒビターまたはボーマン・バークインヒビター製品も含まれることを意味し、制限され

るわけではないが、当該技術分野において知られている方法によって製造される B B I および米国特許第5,217,717号の方法によって製造される B B I 濃厚物が含まれる。更に、動物の前立腺疾患を治療する方法であって、B B I を含む組成物の有効量を投与することによる上記方法を提供する。「動物」により、制限されるわけではないが、ヒトを含めたいずれの哺乳動物も含まれることを意味する。

請求の範囲に記載の組成物の有効量の補助食としてかまたは医薬品としての投与は、本発明の内容の範囲内である。「有効量」という用語は、いくつかの種類のタンパク質分解活性の発現を変化させる量を意味する。このような量は、既知

の方法にしたがって当業者が決定できる。例えば、図1～5で与えられた情報に基づき、ヒトの場合、200～400mg／日の範囲のB B I C 用量が有効であろう [50～100μg／ml × 4000ml (男性の平均血液量) = 200～400mg の B B I C ; 100～400CI 単位の B B I C は、ケネディ, Prevent. Med. 1993, 22, 796-811, 797頁で記載のように、1000～4000mg の B B I C と等しい]。更に、公表された文献からのデータに基づき、1.3mg／日 (ラットの場合) 程度に低く且つ 150mg／日より大きい精製 B B I の用量は、動物の発癌モデルにおいて有効である (セント・クレアら, Cancer Res. 1990, 50, 580-586; ケネディ, J. Nutr. 1995, 125, 733S-743S; ファン・ホーフェ (van Hofe) ら, Carcinogenesis 1991, 12, 2147-2150)。ラットに対する 1mg／日より低い用量もまた有効であると考えられ (ケネディ, J. Nutr. 1995, 上記)、0.001μg／ml 程度の少ない用量は、照射された細胞のトランスフォームーションを抑制するインビトロ (in vitro) 活性を示した (ヤヴェロウら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985, 82, 5395-5399)。これら in vitro の結果は、200mg B B I C ／日のヒト用量よりかなり低い用量が、癌の予防に有効であると示唆していると考えられる。本発明の組成物は、非経口、肛門、局所、経皮または経口で、好ましくは、経口で投与してよい。公表された研究は、B B I が、経口投薬を含めた様々な投与経路を経るのに有効であることを示した (ケネディ, J. Nutr. 1995, 125, 733S-743S; エバンス (Evans) ら, Radiat. Res. 1992, 132, 259-262

）。医薬用または予防用補助食製剤の例には、制限されるわけではないが、シロップ剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、カプセル剤、口内剤（lozenge）および口内洗剤が含まれる。

本発明の一つの実施態様は、薬学的に許容しうる担体中の組成物の懸濁液または溶液を含む液体製剤である。適当な液体担体には、制限されるわけではないが、懸濁化剤、保存剤、着香剤または着色剤を含むエタノール、グリセリン、ポリエチレングリコールなどの非水性溶媒、油または水、またはそれらのいずれか適当な組合わせが含まれる。

もう一つの実施態様において、錠剤の形の組成物は、固体製剤を製造するのに常套手段で用いられる任意の適当な医薬用担体を用いて製造される。このような

担体の例には、制限されるわけではないが、ステアリン酸マグネシウム、デンプン、ラクトース、スクロースおよびセルロースが含まれる。

カプセル剤の形の組成物は、常套のカプセル封入法を用いて製造される。例えば、本発明の組成物を含有するペレット剤、顆粒剤または粉末を、標準的な担体を用いて製造した後、ゼラチン硬カプセル中に充填することができる。或いは、分散液または懸濁液を、1種類または複数の任意の適当な医薬用担体を用いて製造した後、その分散液または懸濁液をゼラチン軟カプセル中に充填することができる。適当な医薬用担体には、制限されるわけではないが、水性ガム、セルロース、ケイ酸塩および油が含まれる。

またもう一つの実施態様において、非経口投与用組成物は、溶液または懸濁液として製剤化することができる。この溶液または懸濁液は、概して、本発明の組成物を滅菌水性担体中または非経口で許容しうる油中に含むであろう。非経口で許容しうる油の例には、制限されるわけではないが、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、レシチン、ピーナツ油およびゴマ油が含まれる。或いは、溶液を凍結乾燥させた後、投与直前に適当な溶媒で還元することができる。

次の実施例は、本発明の実施並びにそこから得られた生成物の特性決定および有用性を例示する。それらは例示の目的でのみ与えられ、本発明を制限するためのものではない。

## 実施例

### 実施例1：細胞系

LNCaP、PC-3および267B1/Ki-rasトランスフォーメーション細胞として知られる3種類のヒト前立腺癌細胞系を研究において用いた。これら細胞系は、進行した前立腺癌の種々の段階であり、そして進行したヒト前立腺癌の研究に好適なモデルである。

LNCaP細胞は、転移性前立腺癌と確実に診断された50才の白人男性のリンパ節中の転移病巣に由来した（ホロセビツ（Horoszewicz）ら, Cancer Res. 1983, 43, 1809-1818；ギバス（Gibas）ら, Cancer Genet.Cytogen.1984, 11, 399-404）。

PC-3細胞は、IV型前立腺腺癌の62才の白人男性患者に由来しており、その患者およびヌードマウス両方に転移している（ケイーン（Kaighn）ら, Invest.Urol.1979, 17, 16-23；オーヌキ（Ohnuki）ら, Cancer Res.1989, 40, 524-534）。

267B1細胞は、ケイーン（Kaihn）ら, Cancer Res.1989, 49:3050-3056によって記載された手順にしたがってSV40初期部分遺伝子を含有するプラスミドでトランスフェクションすることによって胎児前立腺組織から樹立された不死化しているが腫瘍形成していないヒト上皮細胞である。次に、パルダ（Parda）ら, The Prostate 1993, 23:91-98によって記載のように、キルステン（Kirsten）マウス肉腫ウイルスの感染によって活性化されたKi-ras遺伝子の導入により、この細胞系から、トランスフォーメーションされた前立腺細胞系を生じさせた。活性化されたKi-ras遺伝子の導入によってトランスフォーメーションされた細胞系は、形態学的変化および足場非依存性成長（anchorage independent growth）を示した。更に、これら細胞はヌードマウスで腫瘍形成して、不十分に分化した腺癌を発生させた。パルダら, The Prostate 1993, 23:91-98。

細胞は、0.05%EDTA/0.05%トリプシンの溶液を用いて5分間継代培養され、等容量のトリプシンインヒビター（リン酸緩衝食塩水（PBS）中0.1%）の添加によって酵素による細胞解離を停止させる。次に、継代培養さ

れる細胞をペレット化し、P B S 中で洗浄した後、それらの適当な成長培地中に再懸濁させる。例えば、L N C a P 細胞は、10%ウシ胎児血清、2 mMグルタミン、100単位/m1ペニシリン、100 μg/m1ストレプトマイシンおよび2.5 μg/m1菌叢を補足したR P M I 1640培地 (Irvine Scientific, サンタ・アナ, CA) 中で成長させる。P C - 3 細胞は、10%ウシ胎児血清、ピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸、L-グルタミン、2倍ビタミン液 (GIBC O Laboratories, グランド・アイランド, NY) およびペニシリヌーストレプトマイシン (Flow Laboratories, ロックビル, MD) を補足したイーグル最少必須培地 (M.A.Bioproducts, ウォーカースビル, MD) 中で維持される。267  
B 1 / K i - r a s トランスフォーメーション細胞の成長および維持培地は、2%熱失活ウシ胎児血清、5 mg/m1ヒドロコルチゾン、100 U/m1ペニシリンG および100 mg/m1ストレプトマイシンを含有するP 4 - 8 F (Bi

ological Research Faculty and Facility, Inc., イジャムスビル (Ijamsville), MD) から成る。これらの研究では、全部の細胞を、5%CO<sub>2</sub>の給湿雰囲気中において37°Cで維持した。

#### 実施例2：細胞成長の阻害

B B I がこれら細胞系の成長阻害を引き起こすかどうか確認するために、周知の方法にしたがって<sup>3</sup>H-チミジン取込み検定を行った (サミド (Samid) ら, J. Clin. Invest. 1993, 91, 2288-2295)。細胞を、対照培地または50 μg/m1のP B B I 若しくはB B I C を含有する培地中で培養し且つ<sup>3</sup>1 μCi/m1の<sup>3</sup>H-チミジン (DuPont-NEM) と一緒に2時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞をP B S で洗浄し、セルスクレーパーで集め、そして氷冷5%トリクロロ酢酸 (T C A) を用いて沈殿させた。T C A 沈殿性放射能を、液体シンチレーション計数計で定量して、<sup>3</sup>H-チミジン取込み速度を測定した。B B I またはB B I C を含有する培地中で培養された細胞における<sup>3</sup>H-チミジン取込み速度の低下は、P B B I またはB B I C が、DNA合成を抑制することによって前立腺癌細胞の成長を阻害することを示している。

#### 実施例3：成長曲線の作成

成長曲線は、B B I C および P B B I ( $50 \mu g/m^1$  で) の存在下および不存在下において成長した L N C a P、P C - 3 および 2 6 7 B 1 / K i - r a s トランスフォーメーション細胞について作成された。前立腺癌細胞の成長に対する B B I の作用は、9 日間にわたって測定された。平板培養から 12 時間後およびその後 24 ~ 48 時間ごとに、それぞれの処理群から 2 ~ 3 枚の皿中の細胞をトリプシン処理し、そしてクールター計数計で計数して成長曲線を作成した。

#### 実施例 4：サイトメトリ分析 (Cytometric Analysis)

トリプシン処理された細胞はまた、ヨウ化プロピジウムで染色され、そして染色してから 2 時間以内に、サイトメトリ分析をベクトン・ディキンソン (Becton - Dickinson) FACScan フローサイトメーターで行う。赤色蛍光は、 $585 nm$  バンドパスフィルターを介して  $42 nm$  のバンド幅で検出されるであろう。それぞれの試料について 10000 例が集められ、そしてデータは、同時に染色され非同調化された細胞において G1 および G2/M ピーク位置にしたがって置かれたマニュアルゲートに基づいて分析されるであろう。細胞周期のいずれかの特定の段階における細胞の異常蓄積は、P B B I または B B I C が、これら細胞の循環を阻止することによって前立腺癌細胞の成長を阻害していることを示すと考えられる。

#### 実施例 5：浸潤能力に対する作用の測定

L N C a P 細胞の浸潤に対する P B B I ( $100 \mu g/m^1$ ) の作用を、マトリゲル (Matrigel) 被覆膜を用いて研究した。L N C a P 細胞 ( $2 \times 10^4$  個) を、マトリゲル被覆膜上の各室中に播種し且つ  $37^\circ C$  で 5 時間インキュベートした。下方の室に、D U 1 4 5、P C - 3 または W 1 3 8 細胞培養物からのならし培地を化学誘因剤として満たした。それら膜を室から取り出し、そしてライト・ギムザ (Wright-Giemsa) で染色した。膜を越えて侵入した細胞の数を、 $4 \sim 0.25 mm^2$  面積中で計数した。実験は二重反復試験で行われた。

#### 実施例 6：前立腺癌細胞の生存に対する作用の測定

前立腺癌細胞の生存に対する B B I の作用を、トリパンブルー排除検定並びに乳酸デヒドロゲナーゼ (L D H) および P S A 放出検定によって評価する。L D

H放出検定を行うために、LNCaP、PC-3および267B1/Ki-rasトランスフォーメーション細胞を、対照培地または50 μg/mlのBBI若しくはBBCを含有する培地中で48~72時間培養した後、PBSで洗浄し、そしてBBIの存在下または不存在下において血清不含培地（血清は、検定の妨げになるLDHを含有する）中で3~6時間インキュベートする。ならし培地中のLDH活性は、LDH診断キット（Sigma Chemical Company）を用いて測定される。LNCaPは、PSAを生産することが知られている細胞系であるので、LNCaP細胞を用いたならし培地は、培地中のPSA濃度を測定するためにPSA免疫検定によっても分析される。BBIの存在下で培養された前立腺癌細胞を用いたならし培地中のLDHまたはPSAレベルの増加は、細胞内LDHおよ

びPSAを培地中に放出させるBBI誘導細胞致死作用を示している。PBBIまたはBBCで処理された前立腺癌細胞において、トリパンブルー排除検定またはLDHおよびPSA放出検定によって有意に高いレベルの細胞死が検出される場合、更に実験を行って、BBIがアポトーシス（apoptosis）による細胞死を引き起こすかどうか確認する。

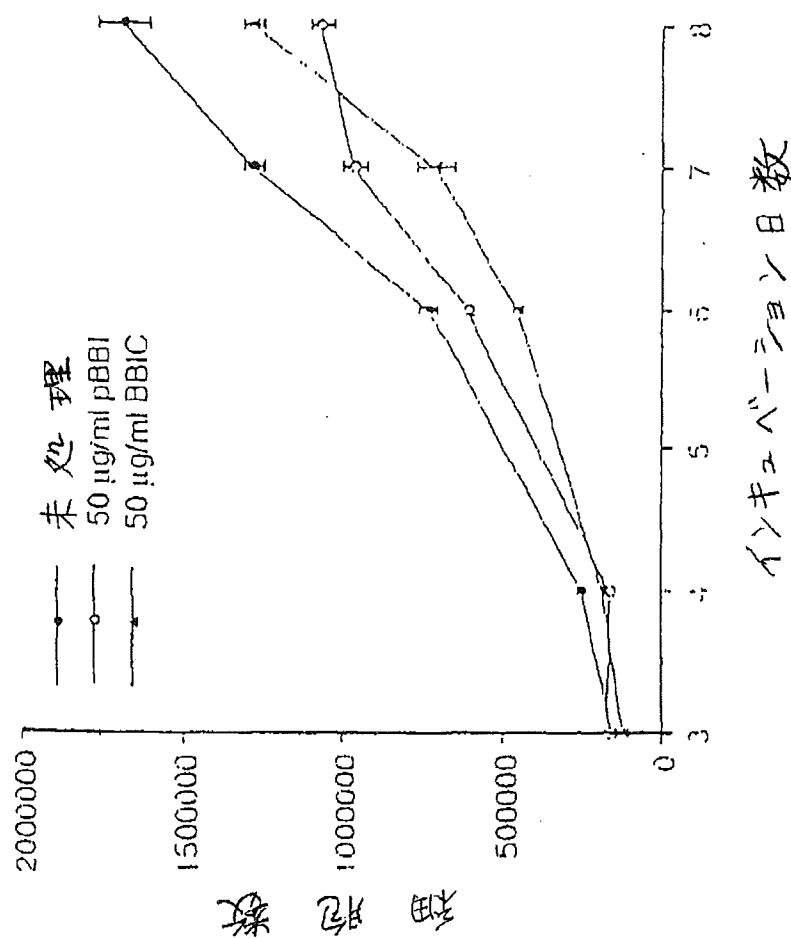
BBI含有または不含培地中で培養された前立腺癌細胞のアポトーシスは、主として、原位置の（*in situ*）フラグメント化DNAのヨウ化プロピジウム（PI）染色およびターミナルデオキシヌクレオチドトランスクレオチド標識付けによって測定される。PI染色は、マシェル（Muschel）ら、Cancer Res. 1995, 55, 995-998に記載されている通りに行われる。これらの研究では、細胞を、PIによる高色素染色の部分を含むフラグメント化された核の形跡について調べる。ターミナルデオキシヌクレオチドトランスクレオチド標識付けは、アポプタグキット（Apoptag kit）（Oncor）を用いて製造者の指示にしたがって行われる。この方法は、ヌクレアーゼで切断されたDNAの3'ヒドロキシ末端の標識付けによってアポトーシスを検出する。PIによって染色されたまたはアポプタグキットを用いて標識された細胞を、蛍光顕微鏡下で調べる。PBBIまたはBBCで処理された前立腺癌細胞におけるアポトーシスの発生の増加は、BBIがアポト

ーシスを誘導することによって前立腺癌細胞の死を引き起こしている証拠である。

ヒト前立腺癌細胞の成長に対するB B I の作用は、当該技術分野において知られている手順にしたがってB A L B / c ヌードマウスで測定される（ホロセビツラ, Cancer Res. 1983, 43, 1809-1818；ウェア (Ware) ら, J.Urol. 1982, 128, 10 64-1067）。40匹のヌードマウスを10匹／群の4群に分ける。二つの群は対照飼料で維持されるが、他の2群には1% B B I C 含有飼料を与える。マウスを適当な飼料のところに入れてから4日後に、それぞれの飼料でのマウスの一方の群に、L N C a P またはP C - 3 細胞を皮下摂取する（細胞 $4 \times 10^4$  個／マウス）。摂取後、それらマウスを、摂取前に与えられていたのと同じ飼料で飼育し且つ60日間観察する。致死時（実験の終了前に致死した場合）または60日の実験期間の最後の屠殺時に剖検を行って、腫瘍数を計数し且つ腫瘍の寸法を測定する。B B I C 含有飼料で維持された群から得られたデータを、対照群からのデータと比較して、B B I C がヌードマウスにおいてヒト前立腺癌細胞の成長および／または転移を阻害するかどうか確認する。

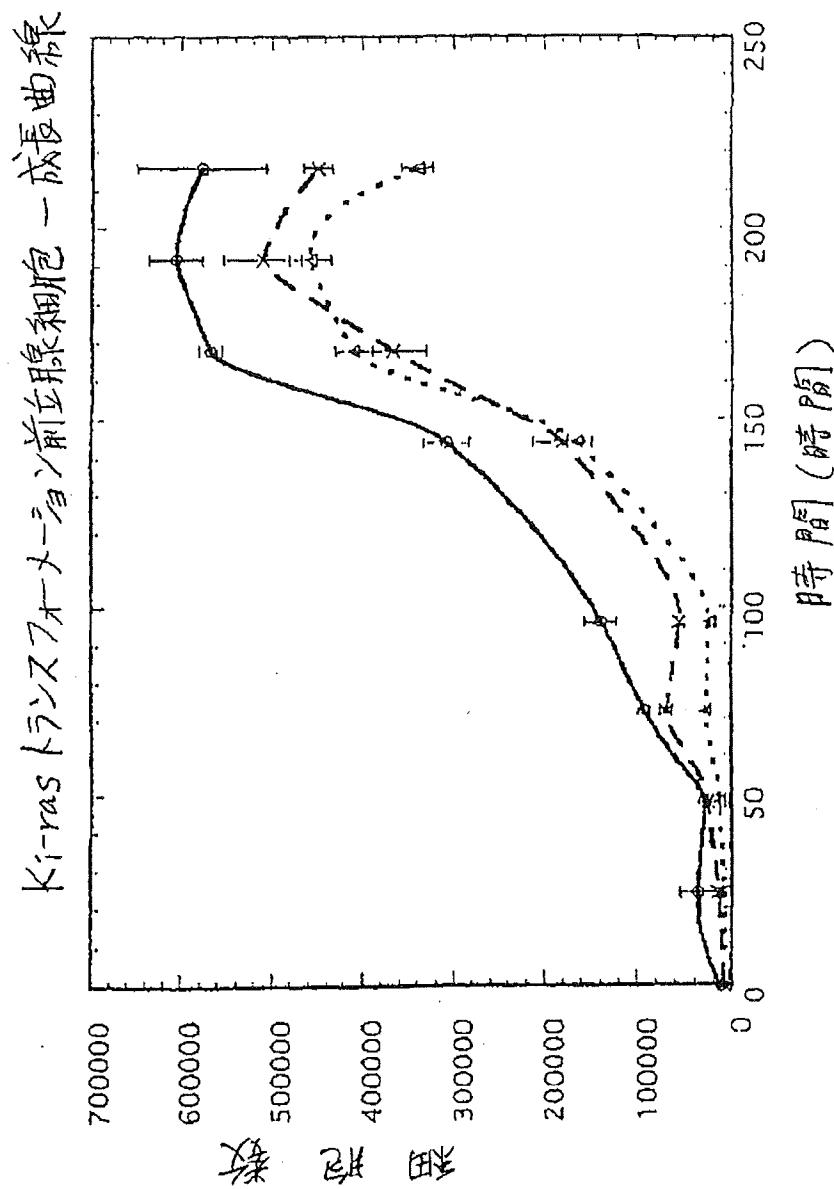
【図1】

Fig. 1



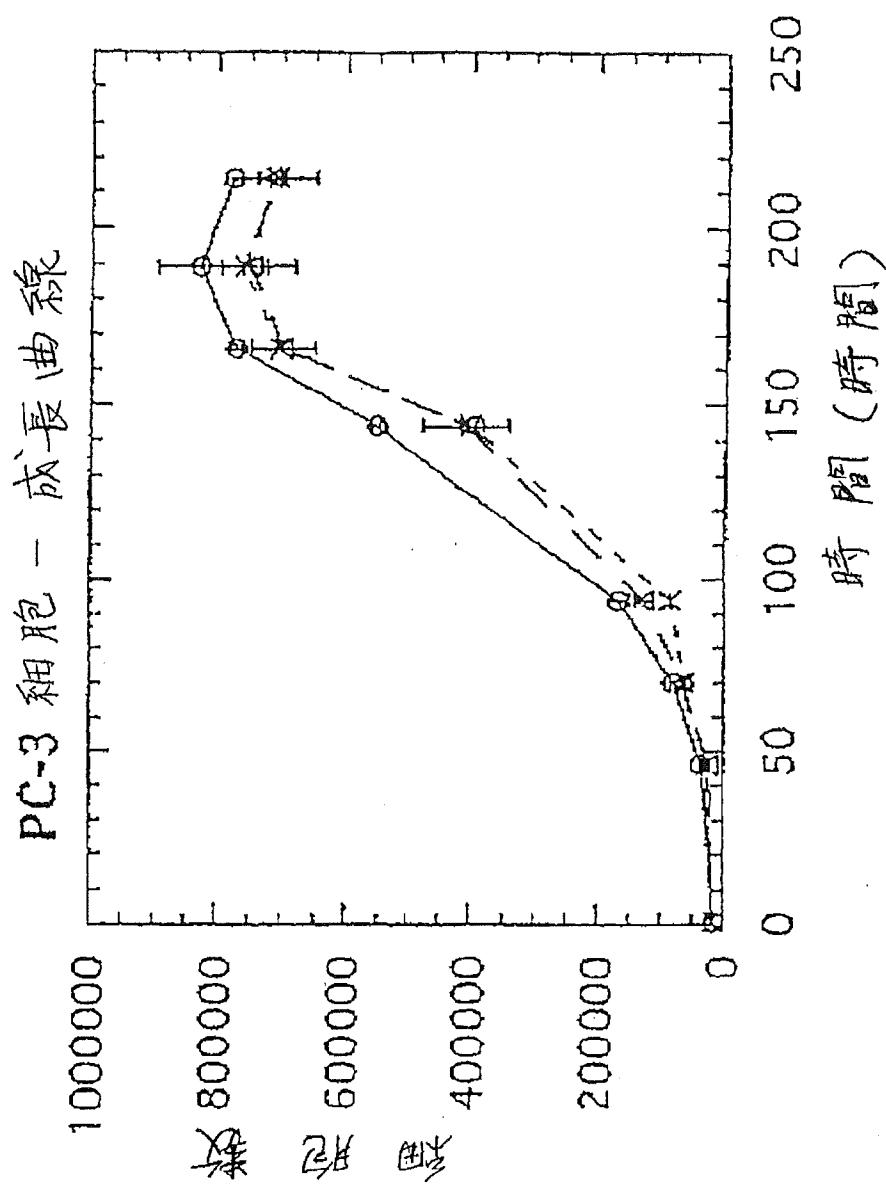
【図2】

Fig. 2



【図3】

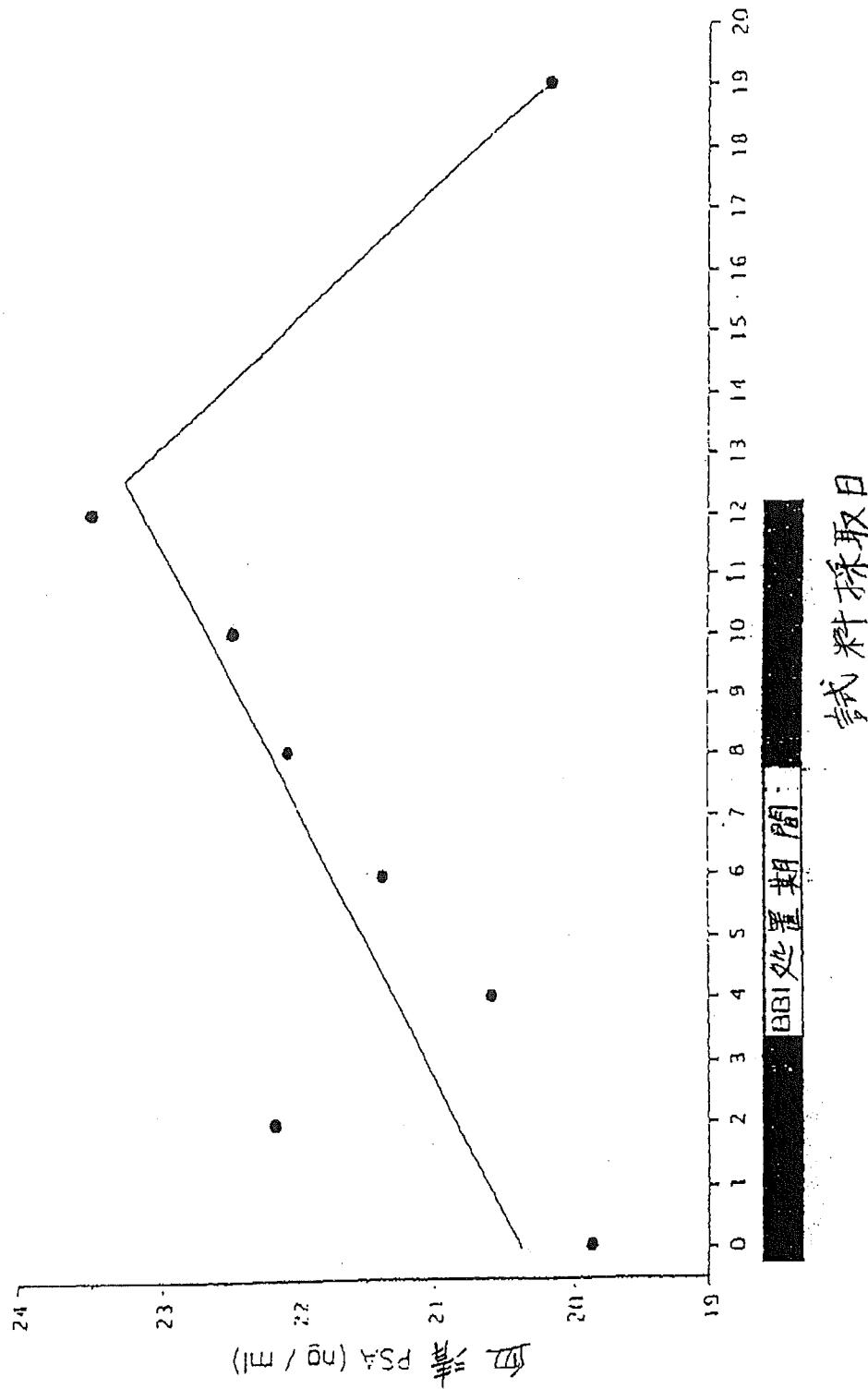
FIG. 3



【図4】

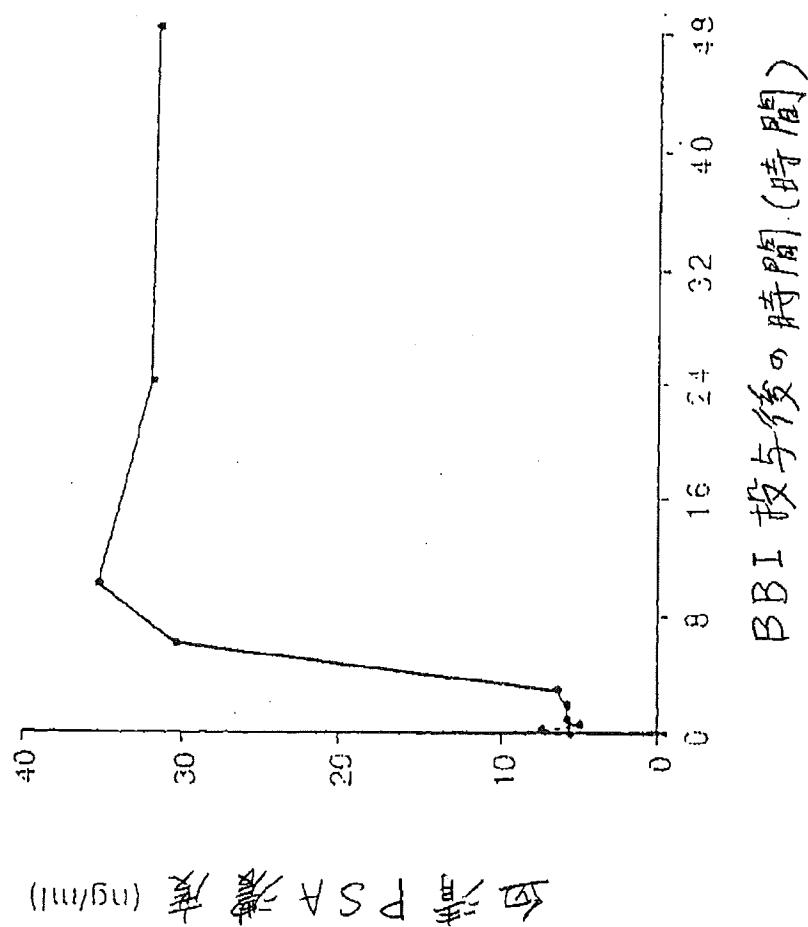
FIG. 4

BBIで12日間処置後の血清中PSAレベル



【図5】

Fig. 5



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US97/00643
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(6) : A61K 7/035, 35/78, 39/175 US CL : 424/69.2, 195.1, 213 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/69.2, 195.1, 213		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched NONE		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, CHEMICAL ABSTRACTS, BIOSIS, DERWENT		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A, P	US 5,550,042 A (J. F. SAMBROOK et al.) 27 August 1996, see entire document.	1-10
A	KENNEDY, A. R. The Evidence for Soybean Products as Cancer Preventive Agents, Journal of Nutrition, 1995, Vol. 125 Supplement, pages 733S-743S.	1-10
X, P	US 5,505,946 A (KENNEDY et al.) 09 April 1996, see entire document.	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search  19 MARCH 1997	Date of mailing of the international search report  18 APR 1997	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer  RALPH GITOMER Telephone No. (703) 308-1235	

## フロントページの続き

(51)Int.C1.<sup>7</sup> 識別記号 F I テーマコード(参考)  
 A 6 1 P 15/10 A 6 1 K 37/64

(81)指定国 E P(A T, B E, C H, D E,  
 D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I T, L  
 U, M C, N L, P T, S E), O A(B F, B J, C F  
 , C G, C I, C M, G A, G N, M L, M R, N E,  
 S N, T D, T G), A P(K E, L S, M W, S D, S  
 Z, U G), E A(A M, A Z, B Y, K G, K Z, M D  
 , R U, T J, T M), A L, A U, B A, B B, B G  
 , B R, C A, C N, C U, C Z, E E, G E, H U,  
 I L, I S, J P, K P, K R, L C, L K, L R, L  
 T, L V, M G, M K, M N, M X, N O, N Z, P L  
 , R O, S G, S I, S K, T R, T T, U A, U S,  
 U Z, V N

(72)発明者 ケネディ, アン・アール  
 アメリカ合衆国ペンシルバニア州19096,  
 ワインウッド, インディアン・クリーク  
 レーン 1010

(72)発明者 クラーク, ラリー・シー  
 アメリカ合衆国アリゾナ州85745, タクソ  
 ン, アイロンウッド・ヒルズ 4315